Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. med. et phil. Friedrich May

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER GALAKTOSE MITTELS GALAKTOSEOXYDASE AUS DACTYLIUM DENDROIDES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Jürgen Zapf
aus Bad Aibling

1965 № 137

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Steinhardt

Referent: Prof. Dr. Dr. F. May

Tag der mündlichen Prüfung: 15.Oktober 1965

Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 337, S. 186–195, 1964

Quantitative Bestimmung der Galaktose mittels Galaktoseoxydase aus *Dactylium dendroides*, I

Von

Werner Fischer und Jürgen Zapf

Walter de Gruyter & Co., Berlin

Quantitative Bestimmung der Galaktose mittels Galaktose-oxydase* aus *Dactylium dendroides*, I

Von

Werner Fischer und **Jürgen Zapf****

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. Januar 1964)

Untersuchungen über den Galaktosestoffwechsel waren bisher d durch erschwert, daß eine spezifische Mikromethode zur Direktbestim mung der Galaktose fehlte. Eine derartige Möglichkeit ergab sich, a Cooper und Mitarbeiter[1] fanden, daß der Pilz *Dactylium dendroide* eine Galaktoseoxydase an das Kulturmedium abgibt. Horecker un Mitarbeiter konnten zeigen, daß das kupferhaltige Ferment in Anwesen heit von Luftsauerstoff Galaktose an C-6 oxydiert, wobei D-*galakt* Hexodialdose und H_2O_2 entstehen[3–5]. Das Ferment greift neben freier un pyranosidisch gebundener D-Galaktose nur verwandte Verbindunge wie z. B. D-Talose, 2-Desoxy-D-galaktose, D-Galaktosamin und *N*-Ac tyl-D-galaktosamin an, während D-Galaktose-phosphatester, L-Galal tose sowie Verbindungen mit Glucose- und Mannosekonfiguration nic umgesetzt werden[4]. Die Spezifität macht das Ferment für quantitativ Bestimmungen von Galaktose oder deren Derivaten geeignet.

Die Galaktoseumsetzung läßt sich im gekoppelten Fermenttest m Hilfe von Peroxydase (EC 1.11.1.7) und einem Chromogen verfolge wobei die Peroxydase das entstandene H_2O_2 für die Oxydation d Chromogens zum Farbstoff verwendet, der dann mit dem Photomet gemessen wird:

$$\text{D-Galaktose} + O_2 \xrightarrow{\text{Galaktoseoxydase}} \text{D-}galakto\text{-Hexodialdose} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Chromogen} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{Farbstoff} + 2H_2O.$$

---

* D-Galaktose:Sauerstoff-Oxydoreduktase, EC 1.1.3.9.

** D 29.

[1] J. A. D. Cooper, W. Smith, M. Bacila u. H. Medina, J. biol. Chemist **234**, 445 [1959].

[2] Der Pilz wurde ursprünglich für *Polyporus circinatus* Fr. gehalten und er kürzlich als *Dactylium dendroides* identifiziert (M. K. Nobles u. C. Madhosing Biochem. biophysic. Res. Commun. **12**, 146 [1963]).

[3] G. Avigad, C. Asensio, D. Amaral u. B. L. Horecker, Biochem. bi physic. Res. Commun. **4**, 474 [1961].

[4] G. Avigad, D. Amaral, C. Asensio u. B. L. Horecker, J. biol. Chem istry **237**, 2736 [1962].

[5] D. Amaral, L. Bernstein, D. Morse u. B. L. Horecker, J. biol. Chem istry **238**, 2281 [1963].

Die bisherigen Untersucher übernahmen als Chromogen Di-*o*-anisidin aus der analogen Glucosebestimmung mit Glucoseoxydase (EC .1.3.4). In der vorliegenden Arbeit wird nachgewiesen, daß Di-*o*-anisidin ie von der Galaktoseoxydase katalysierte Reaktion kompetitiv hemmt. uf der Suche nach einem geeigneten Chromogen fanden wir unter den ubstraten der Peroxydase *o*-Kresol, das sich im gekoppelten Fermentest zur quantitativen Bestimmung von Galaktose eignet und auch für inetische Untersuchungen an der Galaktoseoxydase zu bevorzugen ist.

Methodik

Materialien: Meerrettichperoxydase und Glucoseoxydase-Testgemisch urden von Boehringer & Soehne (Mannheim), Galaktose (chromatographisch rein) on Sigma Corporation und *o*-Kresol (für Chromatographie) von Merck bezogen. ulturen des Pilzes *Dactylium dendroides* erhielten wir von Herrn Professor Dr. B. L. orecker, New York, dem wir auch an dieser Stelle herzlichst danken möchten.

Darstellung der Galaktoseoxydase: Bei der Züchtung des Pilzes und er Darstellung des Fermentes folgten wir im wesentlichen dem von Horecker[4] ngegebenen Verfahren. Der Pilz wurde auf Bierwürze-Schrägagar fortlaufend geüchtet, wovon zur Gewinnung des Fermentes in Subkultur und Hauptkultur abeimpft wurde. Das hierbei verwendete Wachstumsmedium enthielt 0,9% KH_2PO_4 wasserfrei), 0,8% Na_2HPO_4 (wasserfrei), 0,2% $(NH_4)_2SO_4$, 0,02% $MgSO_4$, 0,0008% $MnSO_4$, 0,1% NH_4NO_3 und 0,1% Hefeextrakt sowie 1,5% D-Glucose oder D-Galaktose. Die Züchtung im flüssigen Medium erfolgte bei 30° unter kreisförmigen Schüttelbewegungen (Frequenz 150/Min.).

Die Darstellung des Fermentes gestaltet sich besonders einfach, da dieses vom Pilz in das Kulturmedium abgegeben wird. Nach 24- bis 48stdg. Wachstum der Hauptkultur filtriert man die Kulturflüssigkeit vom Mycel mittels Gaze ab, versetzt e 1 *l* mit 10 g Cellulosepulver und gibt im Verlauf von etwa 2 Stdn. unter ständigem Rühren 700 g Ammoniumsulfat zu. Der Niederschlag wird auf einer Nutsche (Filter: Machery, Nagel Nr. 710) gesammelt, auf eine Säule von 2 cm Durchmesser gebracht und mit 100 cm³ 60% gesätt. Ammoniumsulfatlösung unter Druck gewaschen. Dann wird das Ferment mit 60—100 cm³ 0,1*m* Phosphatpuffer (pH 7) wiederum unter Druck eluiert. Im Eluat wird das Ferment durch Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt und bei 12000 U./Min. abzentrifugiert. Der in 10 cm³ 0,1*m* Phosphatpuffer (pH 7) aufgenommene Niederschlag wird über Nacht bei 4° gegen 0,02*m* Phosphatpuffer (pH 7) dialysiert. Schließlich befreit man die dialysierte Lösung von inerten Eiweißen und Farbstoffen über eine Säule von DEAE-Cellulose, die mit 0,02*m* Phosphatpuffer (pH 7) vorbehandelt wird. Das klare Eluat verwendeten wir als Fermentlösung für unsere Untersuchungen.

Das Ferment ist bei —20° ohne nennenswerten Aktivitätsverlust 6 Monate und länger haltbar. Die Aufbewahrung kann auch nach Gefriertrocknung in Pulverform erfolgen.

Für die Messung der Fermentaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit noch durchweg Di-*o*-anisidin als Chromogen verwendet. Der Ansatz (2 cm³) enthielt: 1,7 cm³ Phosphatpuffer (0,1*m*, pH 7, 170 γ Peroxydase), 0,2 cm³ 0,25*m* Galaktoselösung, 0,1 cm³ Galaktoseoxydaselösung (gegebenenfalls verdünnt) und 0,005 cm³ Di-*o*-anisidinlösung (6,6 mg pro 1 cm³). Als Leerwert wurde für alle Messungen ein Ansatz ohne Galaktose mitgeführt. Nach 10 Min. Inkubation bei 30° wurde im genannten Ansatz bei einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktion im Zeiss-Spektralphotometer bei 436 mμ abgelesen. Nach Horecker[4] wurde als Einheit diejenige Fermentmenge gewählt, die unter diesen Bedingungen eine Extinktion von 1,0 ergibt.

Die Ansätze zu unseren Versuchsreihen werden jeweils in den Legenden der betreffenden Abbildungen beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Versuche mit Di-*o*-anisidin

Bei Verwendung von Di-*o*-anisidin machten wir die Beobachtun daß die Farbstoffbildung bei gleicher Galaktose- und Fermentkonzen tration stark von der Menge an zugesetztem Chromogen abhängig is Systematische Untersuchungen führten zu den Ergebnissen in Abb. Zwischen Extinktion und Galaktosekonzentration besteht keine linea Beziehung. Außerdem nimmt die Extinktion für ein und dieselbe Ga laktosekonzentration in sehr starkem Maße mit der Menge des zug gebenen Chromogens ab. Bei Betrachtung der Einzelkurven fällt au daß das Chromogen bei niedrigen Galaktosekonzentrationen eine wesen lich stärkere Hemmung auf die Farbstoffentwicklung ausübt als b hohen. Wir vermuteten daher eine kompetitive Hemmung durch Di- anisidin. Zur Analyse des Hemmungstyps wurde die Farbstoffentwick lung für eine Galaktoseverdünnungsreihe bei Zugabe verschiedener Chro mogenkonzentrationen untersucht. Trägt man den reziproken Wert de nach 15 Min. Versuchsdauer gemessenen Extinktion nach Lineweave und Burk[6] gegen den reziproken Wert der Galaktosekonzentration au so erhält man Gerade unterschiedlicher Steilheit, die im gleichen Punk die Ordinate schneiden, was bei kompetitiver Hemmung zu erwarte war (Abb. 2).

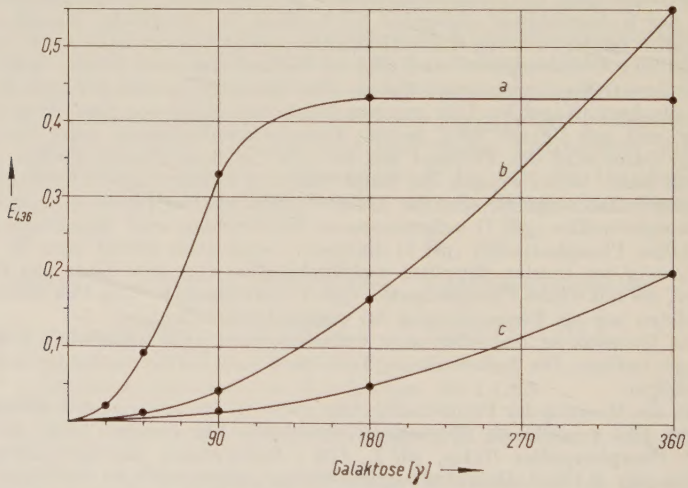


Abb. 1. Hemmung der Farbstoffbildung im Galaktoseoxydase-Peroxydase-System durch steigende Mengen an Di-*o*-anisidin. (a = 13,2 γ, b = 66 γ, c = 132 γ Di-*o*-anisidin pro Ansatz.) In jeder der drei Versuchsreihen wurde 1 cm³ Phosphatpuffer (0,1*m*, pH 7), der 0,05 mg Peroxydase und die entsprechende Chromogenmenge enthielt, mit 0,04 cm³ einer Galaktoseverdünnungsreihe und 0,02 cm³ Galaktose oxydaselösung (8 Einheiten) versetzt und 30 Min. bei 25° inkubiert.

[6] H. Lineweaver u. D. Burk, J. Amer. chem. Soc. **56**, 658 [1934].

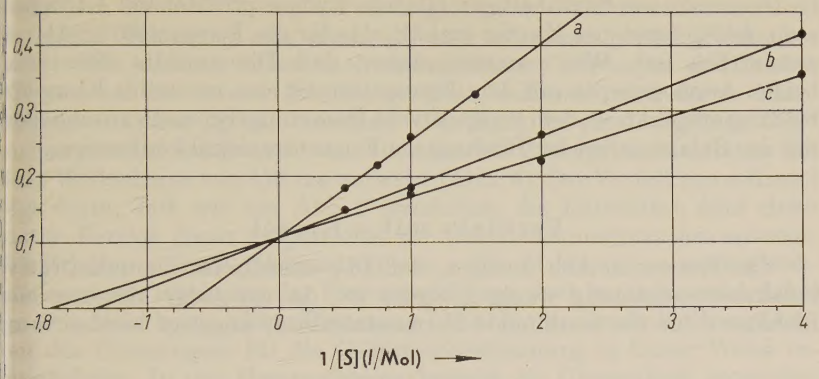


Abb. 2. Kompetitive Hemmung der Galaktoseoxydase-Peroxydase-Reaktion durch Di-*o*-anisidin. (a = 66 γ, b = 33 γ, c = 19,8 γ Di-*o*-anisidin pro Ansatz.) 0,8 cm³ einer Galaktoseverdünnungsreihe wurden mit 0,1 cm³ Phosphatpuffer (0,1*m*, pH 7; enthaltend 80 γ Peroxydase), 0,01 cm³ Galaktoseoxydaselösung (0,3 Einheiten) und 0,03 cm³ einer entsprechenden Di-*o*-anisidinlösung 10 Min. bei 25° inkubiert. Ordinate: Reziproke Extinktion; berechnet für 15 Min. Versuchsdauer.

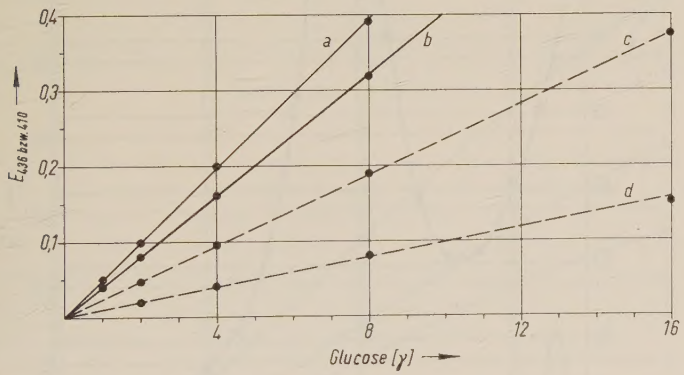


Abb. 3. Der Einfluß der Konzentration von Di-*o*-anisidin (a = 66 und 132 γ, b = 13,2 γ pro Ansatz) und *o*-Kresol (c = 44 γ, d = 440 γ pro Ansatz) auf die Glukoseoxydase-Peroxydase-Reaktion. 1 cm³ Phosphatpuffer-Enzymlösung (Boehringer) wurden mit 0,04 cm³ einer Glucoseverdünnungsreihe und der entsprechenden Chromogenmenge 30 Min. bei 25° inkubiert.

Da das Chromogen im gekoppelten Fermenttest mit Glucoseoxydase-Peroxydase keine Hemmwirkung zeigt (Abb. 3), kann Di-*o*-anisidin nicht an der Peroxydase, sondern muß an der Galaktoseoxydase angreifen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Galaktoseoxydase

im Gegensatz zur flavinhaltigen Glucoseoxydase pro Molekül 1 Gramm-atom fest gebundenes Kupfer enthält, das für die Fermentaktivität verantwortlich ist[5]. Wir vermuten daher, daß Di-*o*-anisidin über seine beiden Aminogruppen mit dem Fermentkupfer eine reversible Komplexbindung eingeht und, dem kompetitiven Hemmungstyp nach zu schließen, mit der Galaktose bei der Bindung am Fermentmolekül konkurriert.

Versuche mit *o*-Kresol

Die Kurven in Abb. 1 zeigen, daß Di-*o*-anisidin für die quantitative Galaktosebestimmung wenig geeignet ist, da vor jeder Messung eine Eichkurve für die betreffende Fermentaktivität angelegt werden muß.

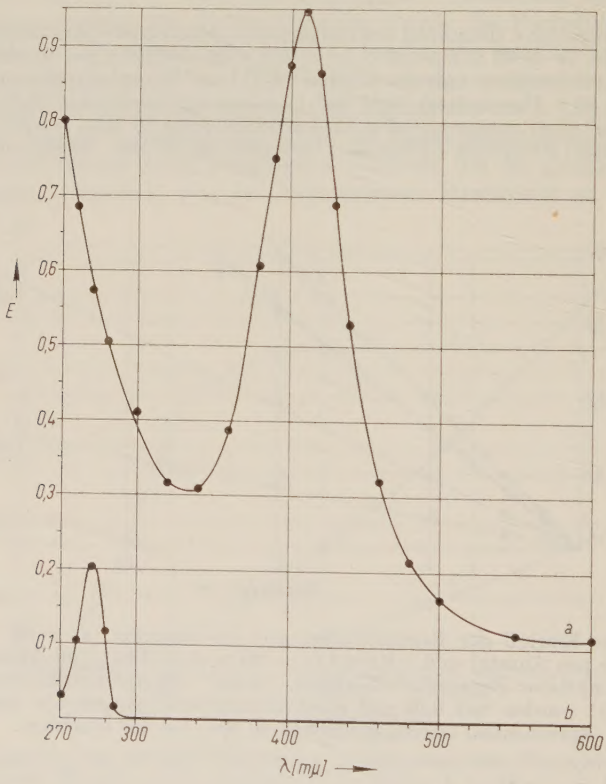


Abb. 4. Absorptionsspektrum von mit Peroxydase oxydiertem (a) und nicht oxydiertem (b) *o*-Kresol. Für a wurde *o*-Kresol im Peroxydase-Galaktoseoxydase-System vollständig oxydiert. Die Messung von b erfolgte im gleichen Ansatz, der jedoch keine Galaktose enthielt. Für beide Messungen wurde als Leerwert der gleiche Ansatz ohne Galaktose und *o*-Kresol verwendet.

Außerdem ist die Messung bei niedriger Galaktosekonzentration durch die starke Hemmung sehr erschwert und mit einem großen Fehler behaftet. Wir suchten daher nach einem neuen Chromogen und fanden o-Kresol als für unsere Zwecke geeignet. o-Kresol wird durch Meerrettichperoxydase in Anwesenheit von H_2O_2 in ein lindgrünes Oxydationsprodukt umgesetzt, das ein scharfes Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 410 mμ aufweist (Abb. 4). Der Vorteil von o-Kresol liegt darin, daß, wie aus Abb. 5 ersichtlich, die Extinktion über einen weiten Bereich linear proportional zur Galaktosekonzentration ansteigt. Bei Erhöhung der Konzentration von o-Kresol kommt es zwar gleichfalls zu einem Rückgang der Farbentwicklung, doch handelt es sich dabei um eine nicht kompetitive Hemmung (Abb. 6), die damit die Brauchbarkeit des Chromogens für die Galaktosebestimmung in keiner Weise beeinträchtigt. In der Hemmwirkung besteht ein Unterschied gegenüber Di-o-anisidin auch insofern als diese im Glucoseoxydase-Peroxydase-System gleichfalls nachweisbar ist (Abb. 3).

Ein Beispiel für die Brauchbarkeit von o-Kresol für die Bestimmung kleiner Galaktosemengen gibt Abb. 7. Es lassen sich in dem beschriebenen Ansatz Mengen von etwa 2—80 γ erfassen, was einer Galaktose-

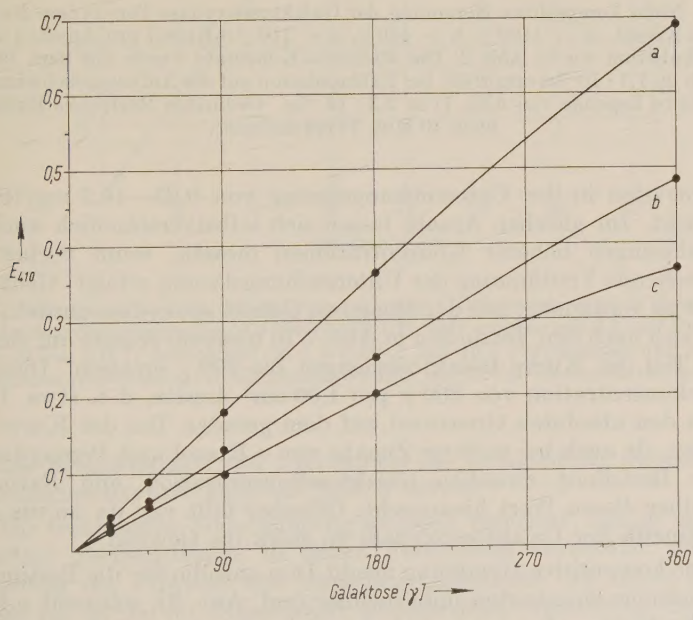


Abb. 5. Farbstoffbildung in Abhängigkeit von der Galaktosekonzentration bei verschiedenen Konzentrationen an o-Kresol. (a = 44 γ, b = 220 γ, c = 440 γ o-Kresol pro Ansatz.) Ansatz und Inkubation wie in Abb. 1, jedoch wurden statt 8 nur 4 Einheiten Galaktoseoxydase verwendet.

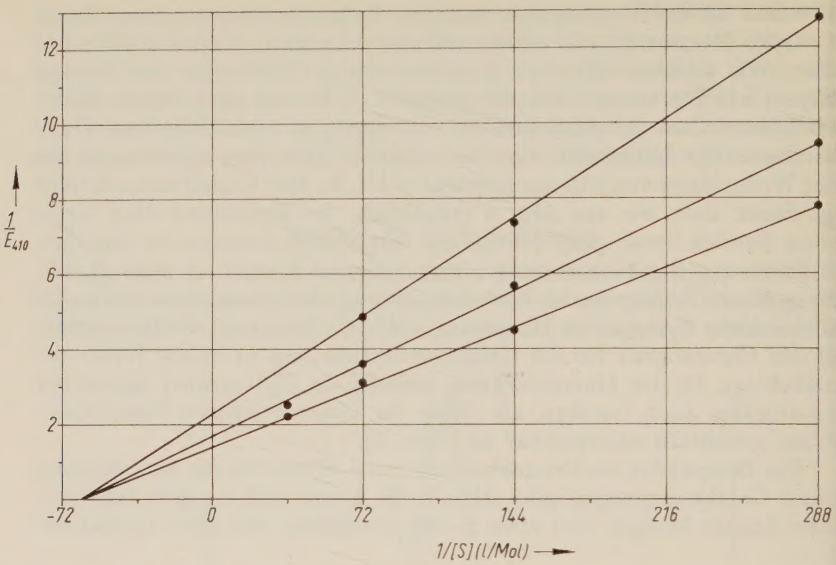


Abb. 6. Nicht kompetitive Hemmung der Galaktoseoxydase-Peroxydase-Reaktio durch *o*-Kresol. (a = 1100 γ, b = 440 γ, c = 110 γ *o*-Kresol pro Ansatz.) Ansat und Inkubation wie in Abb. 2. Die Michaelis-Konstante wurde aus dem 10-Min Versuch zu $1{,}7 \cdot 10^{-2} m$ ermittelt, bei Extrapolation auf die Anfangsgeschwindigkei (vgl. hierzu Legende von Abb. 7) zu $2{,}3 \cdot 10^{-2} m$. Ordinate: Reziproke Extinktio nach 10 Min. Versuchsdauer.

konzentration in der Untersuchungslösung von 0,23—10,3 mg/100 cm entspricht. Im gleichen Ansatz lassen sich selbstverständlich auch Ga laktoselösungen höherer Konzentrationen messen, wenn vorher ein entsprechende Verdünnung der Untersuchungslösung erfolgt. Geht man anstatt zu verdünnen, mit der Menge an Galaktoseoxydase zurück, dan lassen sich nach den Versuchen in Abb. 5 in unserem Ansatz auf dem ge raden Teil der Kurve Galaktosemengen bis 200 γ erfassen. Diese Ga laktosekonzentration von 200 γ pro 1,06 cm³ Ansatz, d. i. etwa $10^{-3} m$ scheint den absoluten Grenzwert auf dem geraden Teil der Kurve dar zustellen, da auch bei weiterer Zugabe von *o*-Kresol und Peroxydase di lineare Beziehung zwischen Galaktosekonzentration und Extinktion nicht über diesen Wert hinausgeht. Offenbar fällt von da an die Sätti gungskinetik der Galaktoseoxydase zu stark ins Gewicht.

Die kompetitive Hemmung macht Di-*o*-anisidin für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten unbrauchbar (vgl. Abb. 2), während *o*-Kreso nach den Untersuchungen in Abb. 6 auch hierfür geeignet ist. Wir fanden für Galaktose eine Michaelis-Konstante von $2{,}3 \cdot 10^{-2} m$, die mit dem vor Cooper[1] auf manometrischem Weg ermittelten Wert von $2{,}1 \cdot 10^{-2} m$ gut übereinstimmt.

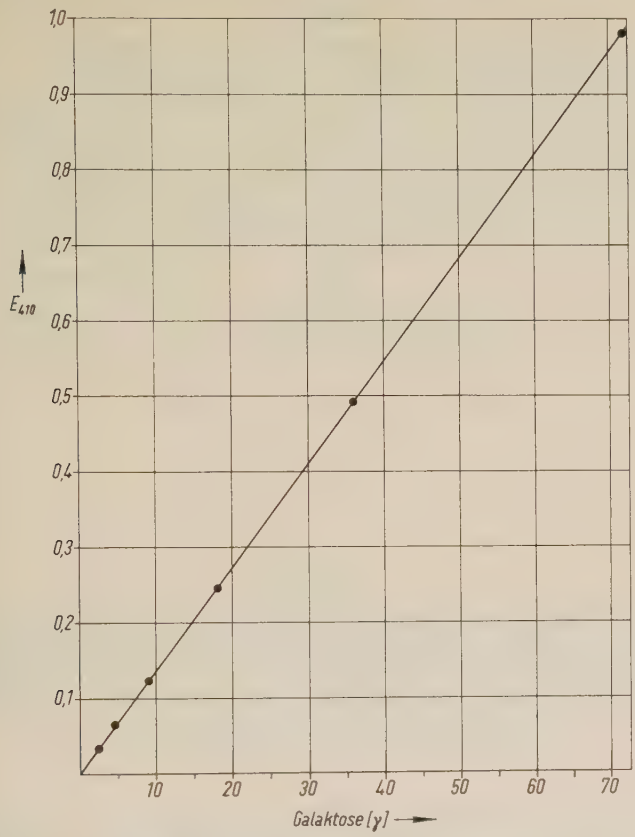


Abb. 7. Zur quantitativen Bestimmung kleiner Galaktosemengen. 0,75 cm³ einer Galaktoseverdünnungsreihe (0,3 bis 9,6 mg/100 cm³) wurden mit 0,1 cm³ Phosphatpuffer (0,1*m*, pH 7; enthaltend 55 γ *o*-Kresol und 40 γ Peroxydase) und 0,05 cm³ Galaktoseoxydaselösung (15 Einheiten) 30 Min. bei 25° im Thermostaten inkubiert.

Die Brauchbarkeit von *o*-Kresol für die Bestimmung der Aktivität der Galaktoseoxydase geht aus Abb. 8 hervor.

Zur technischen Durchführung sei noch vermerkt, daß in allen gekoppelten Fermenttesten, in denen Peroxydase verwendet wird, die Trocknung der Pipetten und sonstigen Glassachen mit Äther zu vermeiden ist, da die im Äther leicht entstehenden organischen Peroxyde durch die Peroxydase umgesetzt werden[7] und zu beträchtlichen Fehlern

[7] Vgl. K. G. Stern, Nature [London] **136**, 335 [1935]; B. Chance, Arch. Biochemistry **21**, 416 [1949].

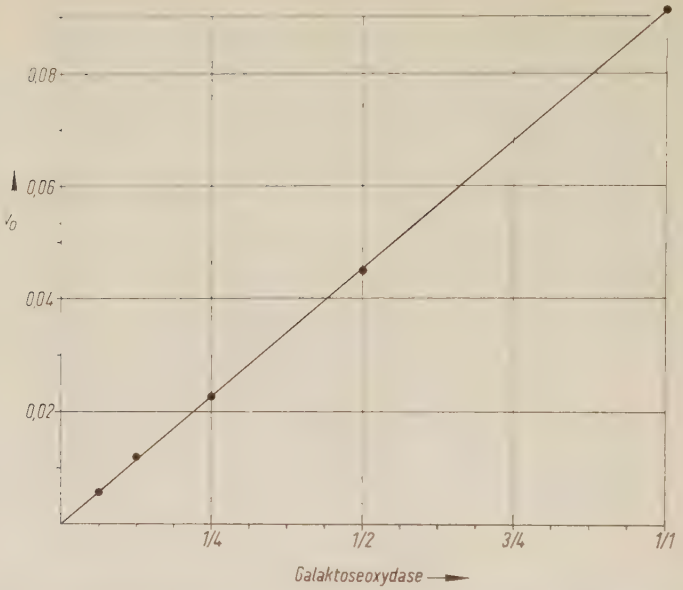


Abb. 8. Proportionalität zwischen Anfangsgeschwindigkeit ($\Delta E_{t\to 0}$) und Fermentkonzentration. 0,75 cm³ einer 600 mg/100 cm³ Galaktoselösung wurden mit 0,05 cm einer Verdünnungsreihe von Galaktoseoxydase (1,0—0,0625 Einheiten) und 0,1 cm Phosphatpuffer (0,1*m*, pH 7; enthaltend 110 γ *o*-Kresol und 80 γ Peroxydase 30 Min. bei 25° inkubiert und die Extinktion in Abständen von 5 Min. gemessen. Aus dem zeitlichen Verlauf wurde jeweils die Anfangsgeschwindigkeit mit einer noch unveröffentlichten Methode ermittelt.

führen können. Die Sicherheit der Meßergebnisse läßt sich dadurch erhöhen, daß man den Ansatz ohne Galaktoseoxydase 10—15 Min. vorinkubiert und durch Ablesung der Extinktion am Anfang und Ende dieser Zeitspanne auf eventuelle Farbentwicklung achtet.

Zusammenfassung

Di-*o*-anisidin hemmt die Reaktion der Galaktoseoxydase aus *Dactylium dendroides* kompetitiv und ist daher im gekoppelten Fermenttest mit Peroxydase für kinetische Untersuchungen der Galaktoseoxydase oder für quantitative Bestimmungen der Galaktose ungeeignet. Als brauchbares Chromogen wurde *o*-Kresol gefunden, bei dessen Verwendung man über einen weiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Galaktosekonzentration erhält. Die Messung erfolgt beim Absorptionsmaximum des oxydierten *o*-Kresols, das bei einer Wellenlänge von 410 mμ liegt. *o*-Kresol kann auch für kinetische Untersuchungen an der Galaktoseoxydase sowie für die Messung der Fermentaktivität verwendet werden.

Summary

Galactose oxidase from *Dactylium dendroides* is inhibited competi-
ıvely by di-*o*-anisidine, which is therefore unsuitable for the coupled
ınzyme test with peroxidase, kinetic studies with galactose oxidase and
ıe quantitative determination of galactose. *o*-Cresol was found to be a
ıitable chromogen, giving a linear relationship between extinction and
alactose concentration over a wide range. Measurements are made at
10 mμ, the absorption maximum of oxidised *o*-cresol. *o*-Cresol can be
sed for kinetic experiments on galactose oxidase and for the measure-
ıent of enzyme activity.

*Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Er-
ıngen, Wasserturmstraße 3.*

Sonderdruck
pe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 339, S. 54—63, 1964

Quantitative Bestimmung der Galaktose mittels Galaktoseoxydase* aus *Dactylium dendroides*, II

Messung der Galaktosekonzentration in Serum und Harn

Von

Werner Fischer und Jürgen Zapf**

Walter de Gruyter & Co., Berlin

Quantitative Bestimmung der Galaktose mittels Galaktoseoxydase aus *Dactylium dendroides*, II[1]

Messung der Galaktosekonzentration in Serum und Harn

Von

Werner Fischer und **Jürgen Zapf****

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 10. August 1964)

Kürzlich berichteten wir über einen gekoppelten Fermenttest z quantitativen Bestimmung der D-Galaktose. In diesem wird die G laktose durch die Galaktoseoxydase aus *Dactylium dendroides* oxydi und das hierbei entstehende Wasserstoffperoxyd unter Verwendung v *o*-Kresol als Chromogen mittels Peroxydase gemessen. Zwischen G laktosekonzentration und Farbentwicklung besteht über einen weit Bereich eine lineare Beziehung[1].

Bei der Galaktosebestimmung in Serum und Harn fanden wir Vergleich zur Messung in rein wäßriger Lösung die Extinktionswe stark erniedrigt. De Verdier und Hjelm[2], welche im Serum einen äh lichen Hemmeffekt feststellten, legten zur Umgehung dieser Schwier keit vor Galaktosebelastungsproben mit dem Nüchternserum der b treffenden Versuchsperson eine Galaktose-Eichkurve an. Abgesehen v der Aufwendigkeit werden hierbei Konzentrationsänderungen der he menden Substanzen während der Versuchsdauer nicht erfaßt, wodur die Methode ihren Vorteil der direkten Galaktosebestimmung verlie Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit Auffindung und E minierung der hemmenden Substanzen. Es gelang dadurch, im Seru auch Galaktosemengen unter 5 mg/100 cm³, wie sie nach oralen Lactos gaben auftreten[3], zu erfassen, was mit den bisherigen Verfahren, welchen nach Entfernung der Glucose mittels Hefe oder Glucoseoxyda (EC 1.1.3.4) die Galaktose mit der Restreduktion bestimmt wurde, u möglich war[4].

Da verschiedene der hemmenden Substanzen die Peroxydas reaktion beeinflussen, sind unsere Untersuchungen auch für die Bestim mung der Glucose mit Glucoseoxydase von Interesse.

Abb. 1 zeigt die Hemmung der Galaktoseoxydase-Peroxydase-R aktion in mit Perchlorsäure enteiweißtem Serum. Die Hemmung äuße

* D-Galaktose:Sauerstoff-Oxydoreduktase, EC 1.1.3.9.

** D 29 (Auszug aus der Dissertation von J. Zapf).

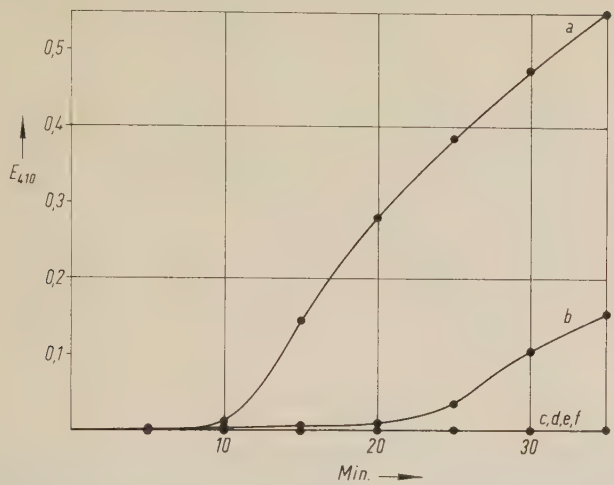
[1] I. Mitteil.: W. Fischer u. J. Zapf, diese Z. **337**, 186 [1964].

[2] C. H. De Verdier u. M. Hjelm, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **7**, 7 [1962].

[3] J. Zapf u. W. Fischer, in Vorbereitung.

[4] Vgl. J. C. Haworth u. J. D. Ford, Lancet **1960**, II, 794.

darin, daß bei niedrigen, in rein wäßriger Lösung noch gut meß-
en Galaktosekonzentrationen hier keine Farbentwicklung auftritt
diese bei höheren Konzentrationen mit zeitlicher Verzögerung er-
t.



. 1. Hemmung der Galaktoseoxydase-Peroxydase-Reaktion im Serum. Galak-
freies Serum wurde mit bekannten Galaktosemengen versetzt, mit dem gleichen
. 10proz. Perchlorsäure enteiweißt und diese in Form ihres unlöslichen Kalium-
es entfernt. Galaktosekonzentrationen im Serum in mg/100 cm³: a = 46,8;
b = 23,4; c = 11,7; d = 5,8; e = 2,9; f = 1,45.

Zur Klärung des Hemmeffektes prüften wir verschiedene Serum-
tandteile gesondert hinsichtlich ihres Einflusses auf die Reaktion.
ciumionen, Harnstoff, Kreatin und Kreatinin waren in Konzentra-
nen, wie sie im enteiweißten Serum vorhanden sind, ohne Wirkung.
e beträchtliche Hemmung ließ sich dagegen mit Harnsäure erzielen.
b. 2 zeigt, daß bei Zugabe von Harnsäure die Farbentwicklung in der
ßrigen Galaktoselösung wie im Serum mit einer zeitlichen Verzöge-
g verläuft. Sobald der anfängliche Hemmeffekt überwunden ist,
eicht sie annähernd die gleiche Geschwindigkeit wie in der reinen
laktosevergleichslösung. Bei verschiedenen Galaktosekonzentrationen
wie aus Abb. 3 ersichtlich, die Farbentwicklung jeweils um etwa den-
en absoluten Wert vermindert, so daß die Eichkurve eine Parallel-
schiebung erfährt.

Aus dem Reaktionsverlauf (Abb. 1 und 2) und der Konstanz der
mmung (Abb. 3) vermuteten wir, daß die Harnsäure durch die Per-
dase oxydiert wird, eine höhere Affinität zum Ferment besitzt als
resol und damit zu Beginn der Reaktion durch Verbrauch des Wasser-
ffperoxyds die Oxydation des Leukofarbstoffes verhindert. Für eine
influssung der Peroxydase-Chromogen-Reaktion sprach außerdem

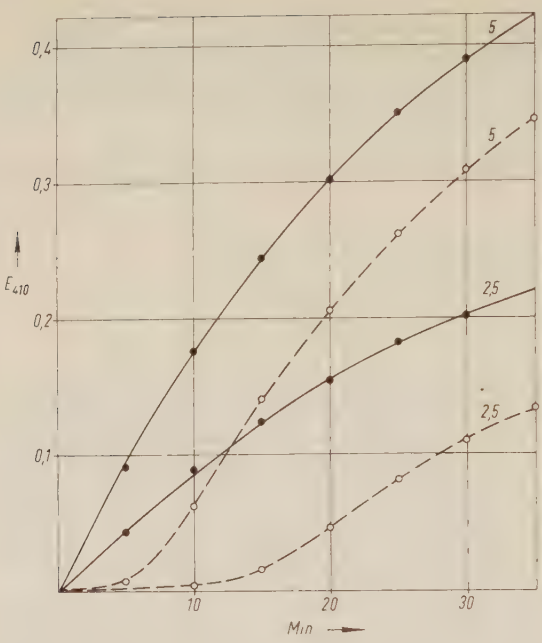


Abb. 2

Abb. 3

Abb. 2. Hemmung der Galaktoseoxydase-Peroxydase-Reaktion durch Harnsä
Die Galaktosekonzentration ist an den Kurven in mg 100 cm³ angegeben.
strichelte Kurven: Zusatz von 0,3 mg Harnsäure pro 100 cm³ Galaktoselöst

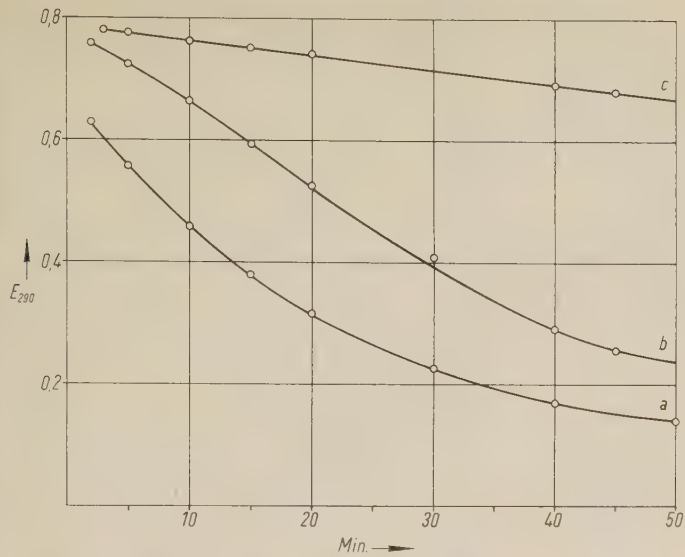
Abb. 3. Konstanz der Harnsäurehemmung bei verschiedenen Galaktosekon
trationen. Ausgezogene Kurve: Galaktoseverdünnungsreihe ohne Harnsä
gestrichelte Kurve: Galaktoseverdünnungsreihe mit 0,3 mg Harnsäure je 100

der Nachweis einer analogen Hemmwirkung der Harnsäure im Gluco
oxydase-Peroxydase-System. Die Umsetzung der Harnsäure durch B
oxydase wird durch die in Abb. 4 wiedergegebenen Versuche bewies
Man erkennt die Oxydation aus dem Abfall der beim Absorptio
maximum der Harnsäure (290 mμ) gemessenen Extinktion.

Wir fanden die Oxydierbarkeit durch Peroxydase auf Harnsäure beschrä
da sich in analogen Versuchen die Purine Xanthin, Hypoxanthin und Gua
sowie die Pyrimidine Uracil und Thymin als unangreifbar erwiesen. Bei Durchsi
der Literatur stellten wir fest, daß Canellakis, Tuttle und Cohen[5] bei Unt
suchungen über die Substrate der Peroxydase gleichfalls eine Umsetzung der Ha
säure fanden und als Reaktionsprodukte Allantoin und Harnstoff nachwiesen.

Für die Galaktosebestimmung im Serum muß daher die Harnsä
entfernt werden. Wir behandelten zu diesem Zwecke das mit Trichl

[5] E. S. Canellakis, A. L. Tuttle u. P. P. Cohen, J. biol. Chemistry 2
397 [1955].



›b. 4. Oxydation der Harnsäure durch Peroxydase. Harnsäurelösung (1,7 mg ›o 100 cm³) wurde mit 0,1*m* Phosphatpuffer, pH 7, und Peroxydase versetzt. Zu ›rsuchsbeginn bei a Zugabe von 0,00085proz. Wasserstoffperoxydlösung, bei b ›r Entwicklung von Wasserstoffperoxyd Zugabe von Galaktose und Galaktose-›ydase. c wie a, jedoch Inaktivierung der Peroxydase durch 20 Min. Erhitzen bei 100°.

›sigsäure enteiweißte Serum mit einem getrockneten Mischaustauscher, ›rch welchen sowohl das Enteiweißungsmittel als auch die Harnsäure ›llständig eliminiert werden. Abb. 5 gibt die Brauchbarkeit dieses Ver-›hrens zur Galaktosebestimmung im Serum wieder: Man findet bei ›usatz von Galaktose zum an sich galaktosefreien Serum dieselben ›xtinktionswerte wie für die analog behandelte Galaktosevergleichs-›sung.

Die Behandlung mit Trichloressigsäure und Mischaustauscher hat ›ißerdem den Vorteil, daß eventuell im Serum vorhandene L-Ascorbin-›ure, die wie Harnsäure als Substrat der Peroxydase die Reaktion stört, ›f nicht näher untersuchte Weise eliminiert wird.

Da bekannt war, daß Glutathion in reduzierter Form die Glucose-›ydase-Peroxydase-Reaktion hemmt[6], prüften wir zur Analyse des ›emmeffektes den Einfluß auf unsere Fermentkette. Nach Abb. 6 hat ›e Hemmwirkung denselben Charakter wie bei Harnsäure, so daß offen-›chtlich auch reduziertes Glutathion als Substrat der Peroxydase mit ›em Chromogen konkurriert. Da Glutathion in beträchtlicher Menge in ›en Erythrocyten vorkommt, muß seine Wirkung bei Galaktose-

[6] F. W. Falses, J. A. Russel u. J. N. Fain, Clin. Chem. [New York] 7, 9 [1961].

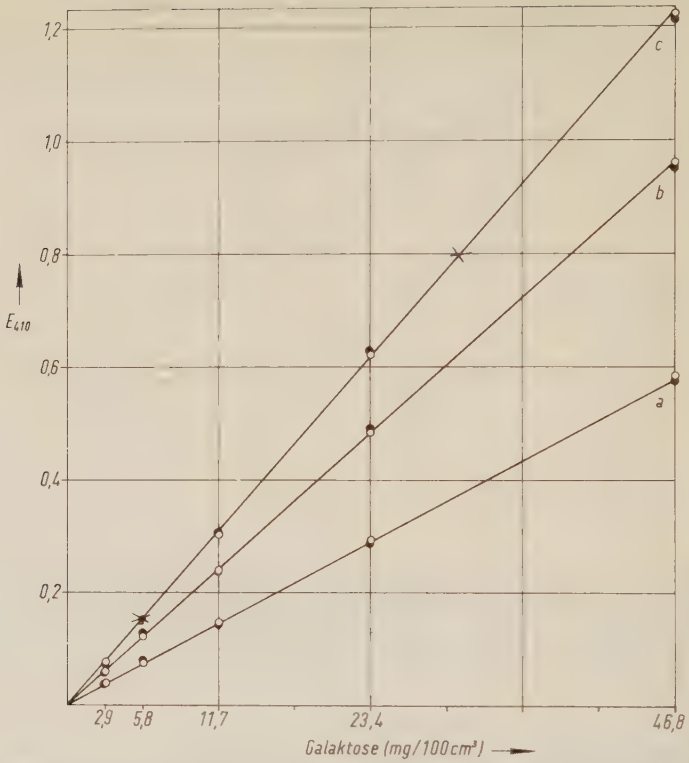
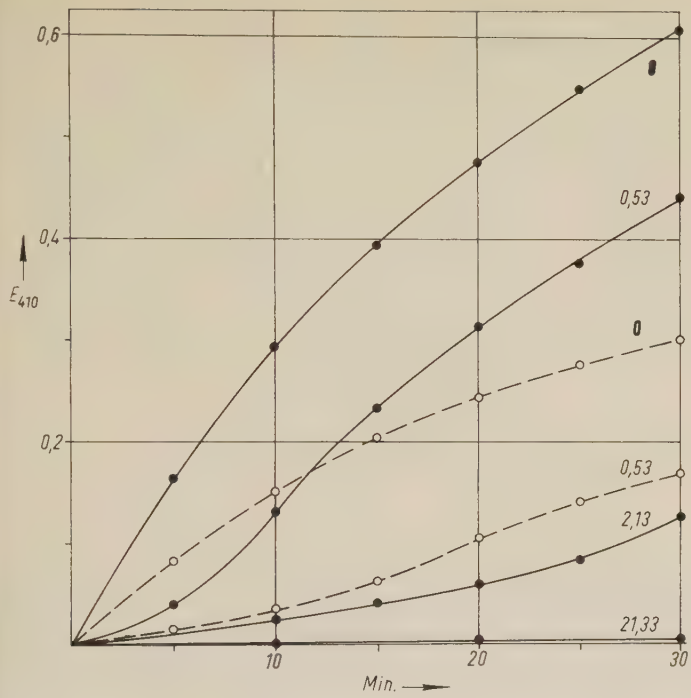


Abb. 5. Messung der Galaktosekonzentration. ● : in mit Galaktose versetztem, n Trichloressigsäure enteiweißtem und mit Mischaustauscher behandeltem Seru ○ : in einer entsprechenden und auf die gleiche Weise behandelten wäßrigen G laktoselösung, die 1% Kochsalz enthielt. 0,75 cm³ der vorbehandelten Untersuchung lösungen wurden mit 0,1 cm³ 0,2*m* Phosphatpuffer, pH 7 (enthaltend 40 γ Peroxyda und 100 γ *o*-Kresol) und 0,05 cm³ Galaktoseoxydaselösung (11 Einh.) bei 25° inkubie Ablesung der Extinktion bei a nach 10 Min., bei b nach 20 Min. und bei c nach 30 Mi Die Gerade c wurde mit Hilfe zweier berechneter Punkte (durch Kreuze geken zeichnet) konstruiert. Mittlere Abweichung (σ) der Meßpunkte von der konstruiert Geraden $\pm$ 2,3%.

messungen im Vollblut berücksichtigt werden. Nach vorläufigen Unte suchungen mit Glutathion in isotonischer Kochsalzlösung ist auch hi eine Entfernung durch den Mischaustauscher möglich.

Im Harn wird die Galaktoseoxydase-Peroxydase-Reaktion noc wesentlich stärker als im Serum gehemmt. Nach Abb. 7 kommt d Harnsäure der größte Anteil an der Hemmwirkung zu. Außerdem wurc für die im Vergleich zum Serum hohen Konzentrationen an Kochsa und Harnstoff eine relativ geringfügige, nicht kompetitive Hemmur nachgewiesen. Wesentlich stärker und, dem Kurvenverlauf nach z schließen, offenbar kompetitiv, hemmt Kreatinin. Mit Ausnahme d



b. 6. Hemmung der Galaktoseoxydase-Peroxydase-Reaktion durch reduziertes utathion. Galaktosekonzentration: 5,33 mg/100 cm³ (ausgezogene Kurven), 6 mg/100 cm³ (gestrichelt). Der Zusatz von reduziertem Glutathion ist an den Kurven in mg/100 cm³ angegeben.

arnsäure scheinen die genannten Harnbestandteile an der Galaktose-ydase anzugreifen, da die Glucoseoxydase-Peroxydase-Reaktion durch nlich hohe Konzentrationen an Harnstoff und Kreatinin nur um 10 w. 6%, durch Kochsalz überhaupt nicht gehemmt wird.

Auch im Harn verwendeten wir zur Elimination der störenden Sub-anzen mit Erfolg einen Mischaustauscher, durch welchen bei geeigneter rdünnung des Harns Kochsalz sowie Harnsäure vollständig, Harnstoff nigstens teilweise entfernt wird. Durch den Kationenaustauscher läßt h auch das stark hemmende Kreatinin quantitativ entfernen.

Zur Auffindung der erforderlichen Bedingungen behandelten wir en mit Galaktose versetzten Normalharn vom spezif. Gewicht 1020 verschiedenen Verdünnungen mit dem Mischaustauscher und stellten i einer Verdünnung von 1:5 und 1:10 noch eine geringe Hemmung der aktion von 5 bzw. 3% fest. Im 1:14 verdünnten Harn trat keine emmung mehr auf, so daß eine Verdünnung von 1:20 als ausreichender cherheitsfaktor auch für konzentrierte Harne erscheint. Die unter esen Bedingungen exakte Meßbarkeit niedriger Galaktosekonzen-

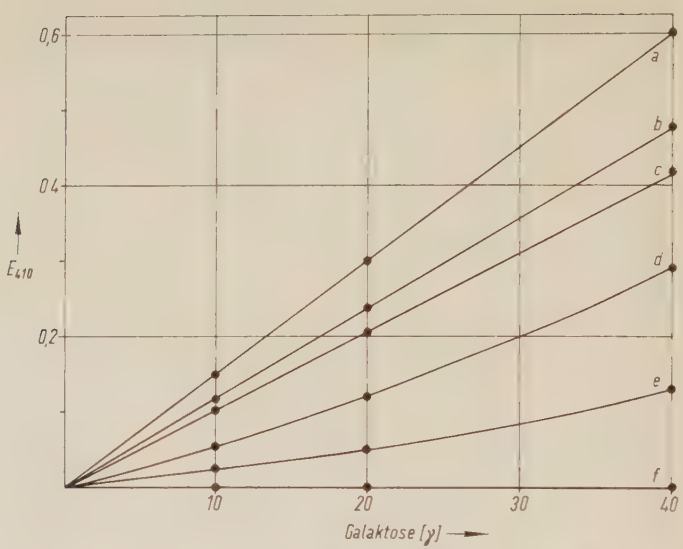


Abb. 7. Einfluß verschiedener Harnbestandteile auf die Galaktoseoxydase-Peroxidase-Reaktion. a = reine Galaktoselösung, b = Galaktoselösung mit 1,44% Kochsalz, c = mit 2,4% Harnstoff, d = mit 0,05% Kreatinin, e = mit 0,2% Kreatin f = mit 0,15% Harnsäure. Die Konzentrationen der zugesetzten Substanzen entsprechen etwa mittleren bis maximalen Werten im Harn.

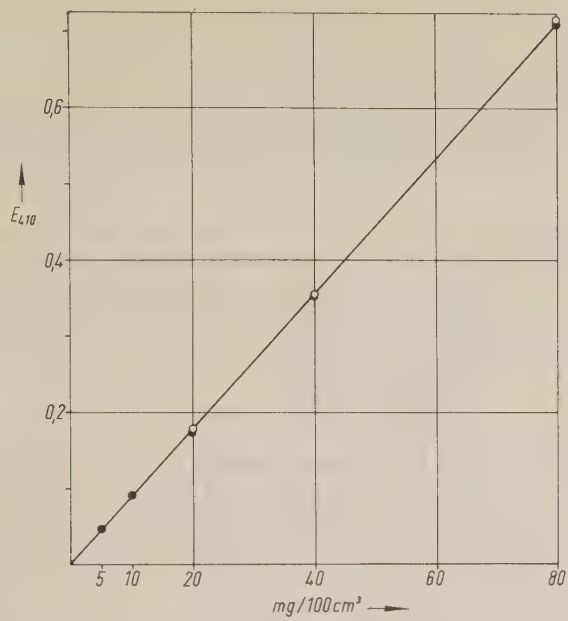
trationen geht aus Abb. 8 hervor. Die Nachprüfung ergab, daß in diese Versuch durch den Austauscher Kochsalz, Harnsäure und Kreatin vollständig, der Harnstoff zu 56% entfernt war. Die geringe Harnsto konzentration von 32 mg/100 cm³ (2,2% der Ausgangskonzentratio ist auf die Reaktion ohne Einfluß, da sich die Hemmung durch Harnst erst bei über 100 mg/100 cm³ geringfügig bemerkbar macht.

Beschreibung der Versuche

Materialien: Meerrettich-Peroxydase und Glucoseoxydase-Testgemis wurden von Boehringer (Mannheim), Urastrat von Gödecke, Galaktose (chromat graphisch rein), Xanthin, Hypoxanthin, Guanin, Uracil und Thymin von Sign Chemical Corporation, *o*-Kresol, Kreatinin und Harnsäure (für wissenschaftlic Zwecke) von Merck, Dowex 1X10 (200 bis 400 mesh, $Cl^{\ominus}$-Form, p. A.) und Dow 50 WX8 ($H^{\oplus}$-Form, p. A.) vom Serva-Entwicklungslabor (Heidelberg) bezogen.

Die Züchtung des Pilzes und Darstellung des Fermentes erfolgte wie in d vorausgehenden Mitteilung[1]. Es erwies sich als zweckmäßig, den Pilz nicht a Galaktose, sondern auf Glucose zu züchten, da offenbar durch Oxydation der G laktose Wasserstoffperoxyd entsteht, durch welches erwiesenermaßen die Oxyda inaktiviert wird.

Messung der Aktivität der Galaktoseoxydase: 0,05 cm³ Galaktos oxydaselösung werden mit 0,75 cm³ einer Lösung, die 600 mg Galaktose je 100 c enthielt, und 0,1 cm³ 0,2*m* Phosphatpuffer, pH 7 (enthaltend 40 γ Peroxydase u 100 γ *o*-Kresol) bei 25° 30 Min. inkubiert. Dabei wird alle 5 Min. die Extinkti bei 410 mμ und einer Schichtdicke von 1 cm gegen einen Leerwert gemessen, d



b. 8. Zur quantitativen Galaktosebestimmung im Harn. ●: Messungen in mit laktose versetztem und mit Austauscher behandeltem Harn (spezif. Gewicht 22; 1:20 verdünnt), ○: Messungen in einer entsprechenden und analog behan-ten wäßrigen Galaktoselösung, die 1% Kochsalz enthielt. Abszisse: mg Galak-e je 100 cm³ unverdünnter Ausgangslösung. 0,75 cm³ der vorbehandelten Unter-hungslösungen wurden mit 0,1 cm³ 0,2*m* Phosphatpuffer, pH 7 (enthaltend 40 γ roxydase und 100 γ *o*-Kresol) und 0,05 cm³ Galaktoseoxydaselösung (28 Einh.) 25 Min. bei 25° inkubiert.

n gesamten Ansatz ohne Galaktose enthält, und aus der so erhaltenen Zeitkurve anfängliche Extinktionsänderung ($\Delta E_{t\to 0}$) ermittelt[1]. Als Einheit wird die-ige Fermentmenge gewählt, die für $\Delta E_{t\to 0}$ einen Wert von 0,1 ergibt.

Behandlung des Austauschers: Der Kationenaustauscher ($Cl^{\ominus}$-Form) rd mit 8proz. NaOH-Lösung in die $OH^{\ominus}$-Form übergeführt, der Anionenaus-uscher in der bereits vorliegenden $H^{\ominus}$-Form verwendet. Beide Ionenaustauscher rden getrocknet, da bei Verwendung der käuflichen Suspension unkontrollierbare rdünnungen der Untersuchungslösung auftreten können. Am besten bewährte h nach Absaugen des Wassers eine etwa 12stdg. getrennte Trocknung beider stauscherkomponenten bei 40° im Trockenschrank. Vor Gebrauch werden die den getrockneten Austauscher in einer Reibschale gut durchmischt. Da — wahr-einlich infolge Quellung — der getrocknete Austauscher eine Konzentrierung Galaktoselösungen von etwa 10% bewirkt, ist auch der Galaktosestandardwert t dem Austauscher zu behandeln.

Bestimmung der Galaktose in Serum und Harn: 0,6 cm³ Serum werden 0,6 cm³ 8proz. Trichloressigsäure enteiweißt. Nach Abzentrifugieren des Nieder-lages werden 0,8 cm³ der überstehenden Lösung mit dem gleichen Vol. an dest. asser verdünnt und mit 0,4 g Mischaustauscher (7 Teile Anionenaustauscher und Teil Kationenaustauscher) versetzt und kräftig geschüttelt. Der Austauscher rd abzentrifugiert (4500 U./Min., 10 Min.) und der Überstand durch ein Filter urchmesser 6 mm, Schleicher & Schüll Nr. 597) gegeben. 0,75 cm³ des Filtrates

werden, wie in Abb. 5 angegeben, mit Puffer-Peroxydase-Chromogen- und Gal toseoxydaselösung inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgt im Spekt photometer bei 410 mμ (Schichtdicke 1 cm) gegen einen Leerwert, der den gesam Ansatz, aber an Stelle des Serums das gleiche Vol. an dest. Wasser enthält.

Für die Galaktosebestimmung im Harn wird dieser 1:20 verdünnt und dav 2 cm³ mit 0,5 g Mischaustauscher (gleiche Teile Anionen- und Kationenaustausch versetzt. Der Austauscher wird wie oben durch Zentrifugieren und Filtrieren e fernt und die so gewonnene Untersuchungslösung, wie in Abb. 8 beschrieben, kubiert.

Zur Berechnung der Galaktosekonzentration dient ein Galaktosestanda wert, zu dessen Ermittlung eine Lösung, die 20 mg Galaktose je 100 cm³ enthä wie das Serum bzw. der Harn behandelt und inkubiert wird. Die Galaktosest dardlösung enthält 1% Kochsalz, wodurch eine Retention des Zuckers am Anion austauscheranteil verhindert wird. Durch ihre lineare Beziehung zur Extinkti (Abb. 5) errechnet sich die Galaktosekonzentration für Serum und Harn wie fol

$$\frac{E_{\text{Serum bzw. Harn}}}{E_{\text{Standardwert}}} \cdot 20\ [\text{mg } 100\ \text{cm}^3]$$

Die Methode ist auf die Erfassung geringer Galaktosekonzentrationen a gestellt. Bei höheren Konzentrationen muß die Untersuchungslösung stärker v dünnt oder die Galaktoseoxydasemenge reduziert werden. Die Galaktosemen im Ansatz darf 200 γ nicht überschreiten, da andernfalls die lineare Beziehu zwischen Galaktosekonzentration und Extinktion nicht mehr gegeben ist[1].

Zum Nachweis der hemmenden Substanzen: Zur Prüfung auf E fernung der Harnsäure durch den Mischaustauscher wurde das Absorptionsma mum der Harnsäure von 290 mμ benutzt. Zum Nachweis von Kreatinin verwendet wir die Jaffé-Reaktion; die Konzentration an Harnstoff wurde mittels Urastr streifen nach entsprechender Verdünnung der Untersuchungslösung ermittelt.

Zusammenfassung

Die quantitative Galaktosebestimmung durch den gekoppelte Fermenttest mittels Galaktoseoxydase und Peroxydase wird im Seru durch die Harnsäure unmöglich, da diese als Substrat der Peroxyda Wasserstoffperoxyd verbraucht, wodurch weniger *o*-Kresol oxydie wird und gegenüber der wäßrigen Vergleichslösung zu niedrige E tinktionswerte gefunden werden. Bei Messungen im Vollblut ist auße dem das in den Erythrocyten vorhandene Glutathion zu berücksichtige das in reduzierter Form ebenfalls als Substrat der Peroxydase wir sam ist.

Auch im Harn fällt die Störung der Reaktion durch die Harnsäu am stärksten ins Gewicht. Hier findet man außerdem auf Grund d hohen Konzentrationen eine beträchtliche kompetitive Hemmung durc Kreatinin sowie eine geringfügigere, nicht kompetitive Hemmung durc Harnstoff und Kochsalz. Die drei letztgenannten Substanzen beei flussen die Reaktion der Galaktoseoxydase.

Die Entfernung der störenden Substanzen durch einen Misc austauscher wird beschrieben, wodurch im Serum und Harn die Gala tosekonzentration gegen einen wäßrigen Galaktosestandardwert g messen werden kann.

Summary

The quantitative determination of galactose by the coupled enzyme tem, galactose oxidase — peroxidase, is not possible in serum, owing the presence of uric acid. The latter is a substrate of the peroxidase; resulting utilization of hydrogen peroxide causes less *o*-cresol to be dized and the extinction value, compared with that of an aqueous ndard, is lowered.

In determinations on whole blood, the glutathione of the erythro-es must also be considered, since, in the reduced form, it is also a ostrate for the peroxidase.

The interference by uric acid is greatest in urine. Because of its h concentration, creatinine exerts a strong competitive inhibition, ile urea and sodium chloride cause a smaller, non-competitive in-ition. The latter three substances affect the galactose oxidase reaction.

The removal of interfering substances by a mixed exchanger is scribed. This permits the measurement of galactose in serum and urine ainst an aqueous galactose standard.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Er-gen, Wasserturmstraße 3.

Lebenslauf

Am 21.1.1940 wurde ich, Jürgen Hans Leopold Zapf, als Sohn des Heizungsingenieurs Josef Zapf und seiner Ehefrau Edith in Marienbad geboren. Nach unserer Aussiedlung im April 1946 nach Oberbayern, besuchte ich vier Jahre lang die Volksschule in Bad Aibling. Im September 1950 trat ich in die Oberrealschule Rosenheim über, wo ich im Juli 1959 das Abitur bestand. Im November 1959 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen für das Studienfach Medizin, legte im Juli 1960 das Vorphysikum und im Februar 1962 das Physikum an derselben Universität ab und beendete am 13.8.1965 in Erlangen das Medizinische Staatsexamen.